

BIOKÉMIAI ANALITIKAI ELJÁRÁSOK

– laboratóriumi gyakorlatok –

MÜLLNER ERZSÉBET – VILLÁNYI ATTILA – KEGLEVICH KRISTÓF



Budapest, 2017

BEVEZETÉS

Biogén elemnek nevezzük az élőlények sejtjeit fölépítő és az életfolyamatokban szerepet játszó elemeket. Ezek közül a sejtek anyagának mintegy 95%-át a szén (C), a hidrogén (H), az oxigén (O) és a nitrogén (N) építi föl. Ezt a négy legnagyobb mennyiségben előforduló elemet nevezzük elsődleges biogén elemnek vagy ANTONIE LAURENT LAVOISIER kifejezésével élve organogén elemnek. A másodlagos biogén elemek közé a foszfor (P), a kén (S), a nátrium (Na), a kálium (K), a magnézium (Mg), a kalcium (Ca) és a klór (Cl) tartozik; egyesek a vasat (Fe) is ide sorolják. A foszfor mindenekelőtt a nukleotidok és a foszfolipidek, a kén pedig a fehérjék (a cisztein és a metionin kéntartalmú aminosav) fölépítésében vesz részt. Az élő szervezetnek további elemekre is szükségük van. Ezeket a kisebb mennyiségben előforduló elemek a mikroelemek (harmadlagos biogén elemek).

Jelen kísérletgyűjtemény olyan egyszerű eljárásokat listáz, melyekkel az élő szervezetet felépítő vagy általuk termelt anyagok összetétele kvalitatív, azaz minőségi szempontból elemezhető. Azaz segítségével arról bizonyosodhatunk meg, a vizsgált minta tartalmazza-e azt a bizonyos elemet / vegyületfajtát, amely után kutatunk. Mindegyik általunk tárgyalt módszer a minta (és a kimutatni kívánt elem / vegyület) roncsolásával jár együtt, hiszen a kimutatás szükséges feltétele, hogy az adott elem atomjait kiszakítsuk a biomolekulából. Legnyilvánvalóbb ez a széntartalom kimutatásakor: a mintát el kell égetnünk vagy legalábbis hőbontásra kell kényszerítenünk ahhoz, hogy a benne lévő kötött szén szén-dioxidá válasson elemi szénre alakuljon. A kísérletek egy része elemeket mutat ki, gyakran lehetővé téve az oxidációs állapot meghatározását is (pl. a ként szulfidion vagy szulfátion formájában, a nitrogént ammóniaként / ammóniumionként vagy nitrátionként határozhatjuk meg). Más kísérletek vegyületcsoportokat indikálnak, így a biuret- és a xantoproteinpróba fehérjék esetén ad pozitív tapasztalatot.

Meg kell említenünk, hogy egyik-másik eljárás kvantitatív mérést is lehetővé tenne. Például a Fehling-próba segítségével a csapadékként levált réz(I)-oxid tömege alapján – a glükózoldat térfogatának ismeretében – kiszámítható a minta glükózkoncentrációja. HERMANN VON FEHLING német vegyész a 19. század közepén kifejlesztett eljárása így a cukorbetegség vizsgálatában nyert fontos szerepet – korábban az orvosnak meg kellett kóstolnia a kivizsgálandó beteg személy vizeletét, hogy meggyőződhesse annak glükóztartalmáról. Innét származik a cukorbetegség latin neve: *'diabetes mellitus'* = mézédés átfolyás. THOMAS WILLIS oxfordi orvos, II. (STUART) KÁROLY angol király udvari orvosa hívta föl a figyelmet az e betegségben szenvedők vizeletének édes ízére. Mondanunk sem kell, hogy a Fehling- vagy az ezüst-tükörpróba szalonképesebb és – mivel számszerű végeredményt ad – pontosabb eljárás.

Visszatérve receptgyűjteményünk ismertetéséhez, a gimnazista diákok tanulmányait szem előtt tartva a kísérletek közé beavagottunk néhány a biológiához kevésbé kapcsolódó, de a kémia érettségien hangsúlyosan szereplő eljárást is (pl. vegyületek relatív széntartalma). Adott esetben a kémia OKTV laboratóriumi gyakorlatára való fölkészülés volt az ihlető (pl. hidroxivegyületek hidroxilcsoportjainak vizsgálata). Így a magasabb igényű diákok számára érdekes, a középiskolai kémia és biológia határán mozgó, gyakorlatorientált összeállítás jött létre. Feltételezzük, hogy az olvasó tisztában van a sejteket fölépítő anyagok (lipidek, fehérjék, szénhidrátok, nukleotidok és nukleinsavak) szerkezetével és biológiai szerepével. Az eljárások elemzésekor meglepően sok szerves kémia (csapadékok, komplexek) is tanulhatunk.

Essék néhány szó az eljárások megvalósíthatóságáról! Eszközigényük nagyon csekély: kémcsövek, oldalsőves kémcsövek, üvegcső, kémcsőállvány, kémcsőfogó, cseppentő, borszeszégő, óraüveg, tölcsér, szűrőpapír. A felhasznált anyagok túlnyomó többsége is könnyen hozzáférhető – a vízmentes ammon-triklorid, az ammónium-molibdenát, a rezorcin, a difenil-amin vagy a Szudán III. festék beszerzése okozhat nehézséget. A vöröshagyma levelében lévő kalcium-oxalát vizsgálatához és a neutrális zsírok Szudán III.-mal történő kimutatásához mikroszkóp is szükséges.

Az eljárások egymásutánosságának sorrendje a biokémia logikáját követi. A kivitelezés szempontjából szerencsésebb, ha az azonos / hasonló alapanyagokat igénylő eljárásokat (pl. tojásfehérje vizsgálata, tej vizsgálata, növényi hamu vizsgálata stb.) gyűjtjük össze egy tanórába.

A Fazekas Mihály Gimnáziumban valamennyi itt ismertetett receptet kipróbáltuk, többségüket diák-kísérletként, kisebb részüket demonstrációs (tanári) kísérlet formájában. Az eljárások részletes ismertetése után néhány tesztfeladat található, amelyeket a megoldások és a felhasznált irodalom jegyzéke követ.

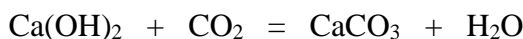
ELSŐDLEGES BIOGÉN ELEMÉK KIMUTATÁSA

1. Kötött széntartalom kimutatása (CO₂-on keresztül)

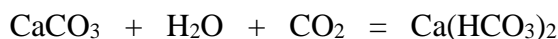
Eljárás: a vizsgálati anyagot (pl. réz(II)-oxidral összekevert keményítőt) kémcső aljba helyezve óvatosan hevítjük. A fejlődő gázokat meszes vízbe vezetjük.

Tapasztalat: a meszes víz megzavarosodik (fehér csapadék).

Magyarázat: a CuO oxidálószer, a keményítő kötött széntartalmát CO₂-dá oxidálja, ami csapadékot képez a Ca(OH)₂-dal:



Ha a CO₂-bevezetés sokáig folytatódik,¹ a csapadék visszaoldódik:



Megjegyzés: ha egy szerves anyagot levegőn hevítünk, háromféle dolog történhet vele. Az első: elég / oxidálódik (mint a keményítő a CuO hatására). A második: hőbomlást szenved, ekkor elszenesedik, azaz fekete lesz. Harmadik lehetőségként – ritkán – lehetséges, hogy a széntartalmú anyag izomerizálódik (pl. az NH₄-cianát hevítve karbamiddá alakul).²

2. Tapogatódzás a vegyületek relatív széntartalmának irányában

Eljárás és tapasztalat: a mintát elégetjük. Minél világítóbb és kormozóbb a lángja, annál magasabb a relatív széntartalma.

Magyarázat: viszonylagosan a telített vegyületek (nyílt láncú: C_nH_{2n+2}) relatív hidrogéntartalma a legnagyobb. Emiatt ezek égéséhez szükséges (arányosan) a legkevesebb oxigén, mivel egy C-atom égése egy O₂-molekulát igényel (→ CO₂), a H-atomé csak ¼-et (→ ½H₂O). Tehát a C-tartalom növekedése egyre több oxigént igényel(ne), ezért a magas széntartalmú vegyületek levegőn való égése tökéletlen. Ennek során a láng belsejében szénzemcsék képződnek – ezek izzanak (ezért világít a láng) és ezek felelősek a kormozó hatásért.

3. Telítetlenség kimutatása

Eljárás: a mintához (pl. gumidarabokhoz, esetleg étolajhoz) brómos vizet adunk és jól összerázzuk, szükség esetén néhány percig állni hagyjuk.

Tapasztalat: a brómos víz elszíntelenedik (étolaj használata esetén kétfázisú rendszer képződik).

Magyarázat:

- A gumi vulkanizált kaucsuk vagy vulkanizált polibutadién (mügumi). Szénláncában találhatóak kettős kötések, ezek lépnek a brómmal addíciós reakcióba.
- Az olaj olyan triglicerid, melyben a glicerint telítetlen szénláncú karbonsavak észteresítik. A szénlánc kettős kötései addicionálják a brómot. Mivel az olaj apoláros, a víz pedig dipólusos molekulákból áll, a két fázis nem elegyedek egymással, kisebb sűrűsége miatt az olaj úszik fölül.

4. Kötött oxigén, illetve aromás jelleg kimutatása

Eljárás: egy jódgolyóbist kísérünk meg benzinben, etil-alkoholban, piridinben (ezt helyettesítheti benzol vagy toluol is) és vízben föloldani. Legutóbbi esetben rövid ideig forralni kell a kémcső tartalmát.

Tapasztalat: a jód a benzinben lilán, az etanolban barnán, aromás oldószerekben vörös színnel oldódik. A hideg víz egyáltalán nem oldja, a forró vízben kismértékben, sárgán oldódik.

Magyarázat: a jód saját színe lila, ezt oxigént nem tartalmazó és nem aromás oldószerekben mutatja. A nagy EN-ú (és emiatt negatív polározottságú) kötött oxigén polarizálja a jód elektronszerkezetét, ezáltal könnyebben gerjeszthetővé teszi, színe barnára mélyül. Az aromás elektronrendszer hasonló változást okoz, a szín ilyenkor vörös lesz.

Megjegyzés: a módszer apoláros vagy amfipatikus molekulákból álló folyadékok esetében működik (hiszen a jódnak oldódnia kell benne).

¹ Ez szemléletesen tehető, ha egy kémcső alján lévő meszes vízbe szívószálon keresztül elég sokáig fújunk (kilélegzett, azaz CO₂-ot jelentősebb mennyiségben tartalmazó) levegőt.

² Ez volt az egyik neves kísérlet, mellyel FRIEDRICH WÖHLER (1800–1882) német vegyész megdöntötte a *vis vitalis*-elméletet (1828).

5. Kötött hidrogén kimutatása (víz formájában)

Eljárás: a vizsgálati anyag óvatos hevítése közben a kémcső felső harmadába kobaltpapírt dugunk.

Tapasztalat: az eredetileg kék színű kobaltpapír³ rózsaszínű lesz. (Ha a szerencse ránk mosolyog, kobaltpapír nélkül is látszik, hogy a kémcső fala bepárasodik.)

Magyarázat: $\text{Co}^{2+} + 6\text{H}_2\text{O} = [\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$

↳ kék

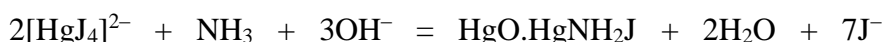
↳ a kristályvizes kobaltsók az akvakomplex miatt rózsaszínűek

6. Nitrogén (NH₃) kimutatása tojásfehérjéből

Eljárás: a vizsgálandó anyaghoz (a tojásfehérjéhez) NaOH-pasztillákat adunk, óvatosan hevítjük, és az eltávozó gázokat Nessler-Winkler-reagens (K₂[HgJ₄] + KOH + KBr)⁴ oldatába vezetjük.

Tapasztalat: (narancs)sárga, esetleg barna csapadék válik le.

Magyarázat: a lúg roncsolja a fehérjét, nitrogéntartalma (legalábbis részben) ammóniává alakult. Ez képez csapadékot a Nessler-Winkler-reagenssel.



7. Nitrogén (NO₃⁻) kimutatása vízmintából

Eljárás: a vizsgálandó oldat csekély térfogatához vele megegyező térfogatú 25 m/m%-os foszforsavoldatot és 5 csepp keményítőoldatot juttatunk, majd 5 csepp KJ-oldatot adunk a rendszerhez.

Tapasztalat: kék szín.

Magyarázat: $8\text{H}^+ + 2\text{HNO}_3 + 6\text{J}^- = 4\text{H}_2\text{O} + 2\text{NO} + 3\text{J}_2$

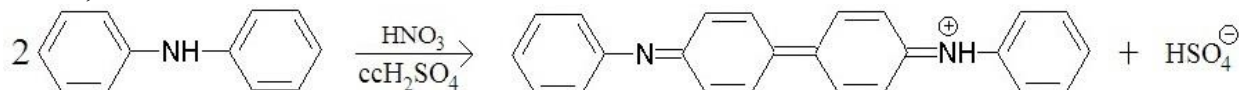
↳ a keményítővel sötétkék komplex
[magyarázatát lásd a 24. kísérletnél]

8. Nitrogén (NO₃⁻) kimutatása vízmintából

Eljárás: a vízmintához difenil-amin tömény kénsavval készített oldatát csöpögtetjük.

Tapasztalat: intenzív kék elszíneződés.

Magyarázat: a kénsav hatására felszabaduló salétromsav a difenil-amint kék színű difenil-benzidinné alakítja. Ennek protonált formájában kiterjedt konjugált kettős kötés-rendszer alakul ki, ami könnyen gerjeszhető, ennek köszönhetően színes.

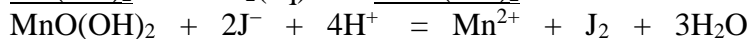
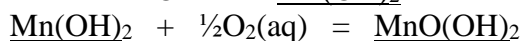


9. Oldott oxigén kimutatása (vízmintából)

Eljárás: a vízmintához mangán(II)-klorid-oldatot, majd NaOH- és KJ-oldatot adunk. Kis idő múlva, lehetőleg rázás nélkül (ezzel ugyanis kívülről oxigént juttatnánk a rendszerbe) múlva sósavat és keményítőoldatot csöpögtetünk a kémcsőbe.

Tapasztalat: az első pillanatokban fehér, ám azonnal barnuló csapadék. A sósavtól az oldat kitisztul, sárgás színt nyer, a keményítő hatására pedig mélykék színt ölt.

Magyarázat: $\text{Mn}^{2+} + 2\text{OH}^- = \underline{\text{Mn}(\text{OH})_2}$



↳ a keményítővel sötétkék komplex

³ Kobaltpapír készítése: szűrőpapírból vágott csíkokat telített CoCl₂-oldatba áztatunk, majd kitergetve megszáritjuk a papírdarabkákat. Ha nagyjából már szárazak, hajszáritóval teljesen kiszáritjuk őket (színük ekkor kék lesz). A kész kobaltpapírt csiszolatos dugóval ellátott üvegben tároljuk, hogy a levegőből ne kapjon nedvességet. (A papírcsíkokat szükség esetén ismételt hajszáritós kezeléssel lehet vízmentessé tenni.)

⁴ JULIUS NEBLER (1827–1905) német agrokémikus 1856-ban publikált reagens oldatában csak K₂[HgJ₄] + KOH szerepelt. WINKLER LAJOS (1863–1939), a budapesti tudományegyetem professzora a higany(II)-jodid oldatban tartására KBr-ot használt. Az így kapott kémszernek előnye, hogy teljesen színtelen (az eredeti Nessler-reagens enyhén sárga színű), így a csapadék leválását még könnyebben észlelhetjük.

MÁSODLAGOS BIOGÉN ELEMÉK KIMUTATÁSA

10. Kalcium (Ca²⁺) kimutatása talajkivonathoz

Eljárás: a talajkivonathoz (ennek híján gipszes vízhez) acetont adunk.

Tapasztalat: kellő rázogatás után fehér csapadék.

Magyarázat: a talajok gipsztartalma acetonos közegben csak kismértékben oldódik, míg a többi só általában jól. Így a vizes oldathoz adott aceton hatására a gipsz kiválik.

11. Kalcium (Ca²⁺) kimutatása csapvízből

Eljárás: a vízmintához ammónium-oxalát-oldatot adunk.

Tapasztalat: kellő rázogatás után fehér csapadék.

Magyarázat: $\text{Ca}^{2+} + (\text{COO})_2^{2-} = \text{Ca}(\text{COO})_2$

Megjegyzés: hasonló elven működik a Sulkowich-reagens,⁵ amellyel a vizelet Ca²⁺-tartalmát mérhetjük kalcium-oxalát, azaz fehér csapadék formájában.

12. Kalcium-oxalát (CaC₂O₄) vizsgálata vöröshagyma héjában

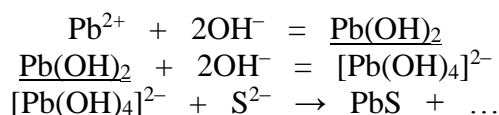
Eljárás: a vöröshagyma külső, száraz levelének kis darabját tárgylemezre helyezük, lefedjük, majd mikroszkóp alatt megvizsgáljuk. Ezután a fedőlemezt felemelve 20 m/m%-os kénsavat cseppentünk a levelre, ismét lefedjük, másodszer is megnézzük a mikroszkóppal.

Tapasztalat és magyarázat: az első esetben hasáb formájú, a végein kihegyesedő kalcium-oxalát (CaC₂O₄) kristályokat látunk, a kénsavas kezelés után hosszú, tű alakú kalcium-szulfát (CaSO₄) kristályok keletkeznek.

Megjegyzés: A CaC₂O₄ a növény anyagcseréjének a végterméke. Azt az eljárást, amely során az élő szövetekben kémiai módszerekkel anyagokat mutatunk ki, hisztokémiai kimutatásnak nevezzük.

13. Kén (S²⁻) kimutatása tojásfehérjéből

Eljárás, tapasztalat, magyarázat: kémcsőbe ólom(II)-nitrát-oldatot öntünk, s addig csepegtetünk hozzá NaOH-oldatot, míg a kezdetben keletkező fehér csapadékot (Pb(OH)₂) a lúg fölöslege föl nem oldja ([Pb(OH)₄]²⁻). Ehhez a színtelen oldathoz fehérjeoldatot adva és a kémcső tartalmát rövid ideig forralva fekete csapadék (PbS) képződésért tapasztaljuk.



14. Kén (SO₄²⁻) kimutatása

Eljárás: a vizsgálandó anyagot (növényi hamu) 0,1 mol/dm³-es sósavban melegítve föloldjuk, majd le-szűrjük. A szűrlethez BaCl₂-oldatot adunk.

Tapasztalat: fehér csapadék.

Magyarázat: $\text{Ba}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} = \text{BaSO}_4$

Megjegyzés: a növényi hamu sav hozzáadásakor pezseg (színtelen, szagtalan gáz fejlődik) – ez hamuszirtartalmára (K₂CO₃) utal.



⁵ HIRSH SULKOWITCH (szül. 1906) brit orvos 1954. évi szabadalma. A róla elnevezett reagens készítése: 145 cm³ desztillált vízben föloldunk 2,5 g oxálsavat és 2,5 g NH₄-oxalátot, majd 5 cm³ tömény ecetsavat adunk az oldathoz, és homogenizáljuk.

15. Foszfor kimutatása növényi hamuból

Eljárás: kémcsőbe juttatott növényi hamura 2-3 cm³ 2 mol/dm³-es salétromsavat öntünk, felforraljuk az oldatot, majd óvatosan – nehogy leforrázzuk vagy megnitráljuk magunkat – átszűrjük. (A szűrletet megfelezzük, hogy másik feléből a Fe³⁺-iont is ki tudjuk majd mutatni.) A szűrlethez kb. 5 csepp ammónium-molibdenát-oldatot juttatunk.

Tapasztalat: sárga elszíneződés, majd csapadék.

Magyarázat: $12(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4 = (\text{NH}_4)_3\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4 + \dots$

16. Vas (Fe³⁺) kimutatása növényi hamuból

Eljárás: a növényi hamu salétromsavas oldásából származó szűrlethez (lásd előző kísérlet) néhány csepp kálium-rodanid-oldatot csöpögtetünk.

Tapasztalat: vörös elszíneződés (a töménységtől függően csapadék vagy oldat).

Magyarázat: $\text{Fe}^{3+} + 3\text{SCN}^- = \text{Fe}(\text{SCN})_3$
 $\text{Fe}(\text{SCN})_3 + \text{SCN}^- = [\text{Fe}(\text{SCN})_4]^-$

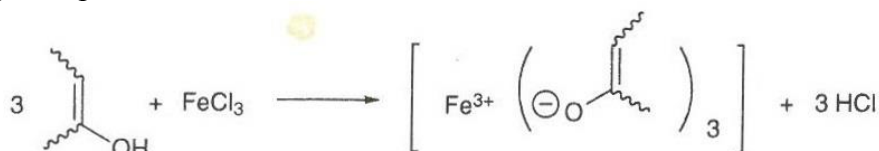
HIDROXIVEGYÜLETEK

17. Fenolos hidroxilcsoport kimutatása vas(III)-klorid-oldattal

Végzésének módja: a vizsgálandó minta oldatához néhány csepp 1 m/m%-os FeCl₃-oldatot adunk.

Tapasztalat: pozitív próba esetén lila (esetleg kék, zöld, vörös vagy bíbor) elszíneződés.

Magyarázat: komplexképződés.

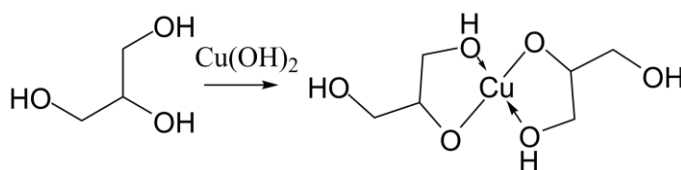


18. Vicinális –OH-ok kimutatása réz(II)-hidroxiddal

Végzésének módja: egy kémcsőbe Cu(OH)₂-csapadékot választunk le (kevés CuSO₄-oldat + alapos feleslegben adagolt NaOH-oldat), majd hozzácepegtetjük a vizsgálandó mintát.

Tapasztalat: pozitív próba (pl. glikol vagy glicerín) esetén a kék csapadék mélykék színnel oldódik.

Magyarázat: komplexképződés.

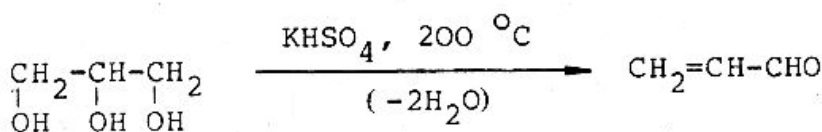


19. Glicerín kimutatása

Végzésének módja: száraz kémcsőbe kevés étolajat vagy zsiradékot teszünk. Szilárd KHSO₄-ot adunk hozzá, és óvatosan melegítjük, míg a kémcsőből kellemetlen szagú gőzök nem távoznak. Ekkor csipezzel ezüst(I)-diammin-komplexes (magyarul ezüstitűkorréagensbe áztatott) papírt tartunk a kémcső felső harmadába.

Tapasztalat: barnásfekete elszíneződés.

Magyarázat: a KHSO₄-ból hevítés hatására H₂SO₄ képződik, ez a glicerint vízelvonással akroleinné alakítja, amely aldehidként adja az ezüstitűkórpróbát.

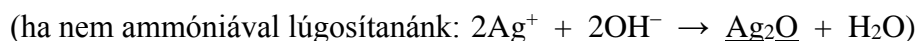
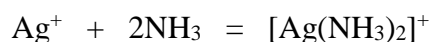
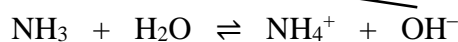
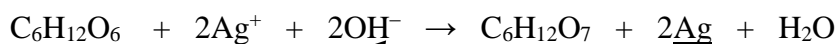


SZÉNHIDRÁTOK

20. Ezüsttükörpróba (Tollens-próba⁶)

Végzésének módja: elsőként a reagenst készítjük el. Ezüst-nitrát-oldatba addig csepegtetünk 1-2 mol/dm³ koncentrációjú NH₃-oldatot, amíg a kezdetben kiváló sárgásbarna csapadék víztiszta oldat képződése közben vissza nem oldódik. Ezután a reagenshez töltjük a mintát, majd kémcsőfogóban melegítjük az oldatot.

Tapasztalat: ha a minta tartalmazott aldehidet, az oldat színe sötétedik, rázkódásmentes lehülés esetén fém ezüst válik ki a kémcső falára. A legszebb ezüsttüköröt 5 m/m%-os glükóz oldatával gyárthatjuk.



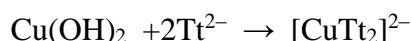
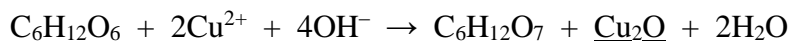
Magyarázat, megjegyzések:

- Az ezüsttükörreagens komplexált ezüstiontartalmát az aldehidek képesek redukálni (alifásak, vagyis nyílt láncúak és aromásak egyaránt).
- A monoszacharidok mindegyike adja az ezüsttükörpróbát (a ketózok is, hiszen lúgos közegben aldózzá izomerizálódnak), a diszacharidok közül a szacharóz nem (hiszen glikozidkötésében mindkét alkotó monoszacharid a glikozidos hidroxilcsoportjával vesz részt, így egyik sem tud oxocsoportot tartalmazó formává izomerizálódni), a többi igen. A poliszacharidok nem redukáló hatásúak.

21. Fehling-próba⁷

Végzésének módja: Egy kémcsőben Fehling-I-oldathoz (CuSO₄) addig csöpögtetünk Fehling-II-oldatot (K-Na-tartarát / Seignette-só), amíg a kezdetben kiváló kék csapadék föl nem oldódik. A homogén, mélykék színű oldathoz hozzáadjuk a mintát. Rázva melegítjük, mert könnyen kilő.

Tapasztalat: keki, barna, majd vörös csapadék válik ki – esetenként (pl. HCHO-ből) fémréz is keletkezhetik.



↳ tartarátion = 2,3-dihidroxi-szukcinát-ion

Megjegyzések:

- A Fehling-próba csak alifás aldehideket mutat ki.
- Érzékenyített változata: Benedict-próba.⁸ A Benedict-reagens CuSO₄, Na-citrát és Na₂CO₃ vizes oldata. Ehhez adják a vizsgálandó oldatot, főlforralják, majd vízfürdőbe helyezik, ahol 4–10 perc alatt színváltozás észlelhető (illetve az oldat kék marad, ha nem volt benne aldehid): zöld, sárga, narancssárga, vörös, barna. A Benedict-reagens előnye, hogy a Fehling-reagenssel (amelyet mindig frissen kell készíteni) ellentétben nem bomlik, ezért sokáig eltartható.

22. Kénsavas próba

Lényege: ketózok és aldózok megkülönböztetése.

Végzésének módja: a vizsgálandó szénhidrát oldatát kémcsőbe töltjük, pipettával tömény kénsavat rétegzünk a kémcső aljára.

Tapasztalat: ketózoknál gyors(abb)an megjelenő barna gyűrű az érintkezési felületen.

Magyarázat: a kénsav az érintkezési felületen elszenesíti a cukrot. Az aldózok esetén lassabb a reakció (a kimutatás viszonylagos).

⁶ BERNHARD CHRISTIAN GOTTFRIED TOLLENS (1841–1918) német vegyész módszere.

⁷ HERMANN VON FEHLING (1812–1885) német vegyész 1849. évi eljárása.

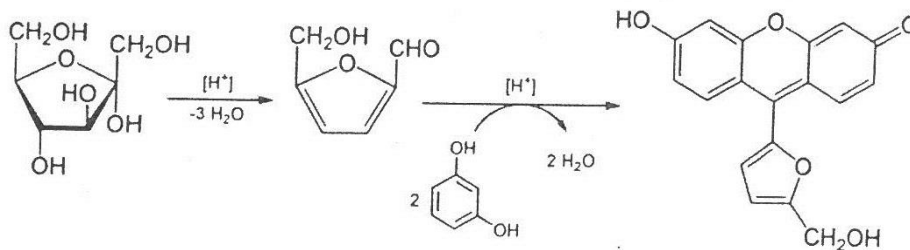
⁸ STANLEY ROSSITER BENEDICT (1884–1936) amerikai kémikus technikája.

23. Seliwanoff-próba⁹

Lényege: ketószok és aldószok megkülönböztetése.

Végzésének módja: a vizsgálandó szénhidrát oldatához hozzáadjuk a reagenst (25 m/m%-os sósavban oldott rezorcín), majd addig forraljuk a kémcső tartalmát, míg el nem kezd megpirosodni.

Tapasztalat: a ketószok hamarabb veszítenek vizet, hamarabb reakcióba lépnek, az oldat szinte azonnal megpirosodik (idővel vörösbarna üledék keletkezik benne). Ezt a reakciót is adják az aldószok, de sokkal lassabban.



24. Keményítő kimutatása

Végzésének módja: a vizsgálandó mintához néhány csepp Lugol-oldatot¹⁰ (KJ_3) adunk.

Tapasztalat: pozitív próba esetén sötétkék szín.

Magyarázat: a jód a keményítővel mélykék komplexet képez. A jód bebújik a keményítő hélixébe, az ott lévő $-OH$ -csoportok nagy EN-ú és negatív polározottságú oxigénatomjai polarizálják, azaz deformálják a J_2 -molekula elektronszerkezetét, mely így könnyebben gerjeszthető, színe mélyül.

Megjegyzés: a komplex az oldatot forralva elveszíti színét (a jódmolekula kitáncol a hélixből, mert megnő a mozgási energiája), de lehűtve visszaáll a kék szín.

FEHÉRJÉK KIMUTATÁSA

25. Biuretpróba

Végzésének módja: a vizsgálandó oldathoz azonos térfogatú, aránylag tömény (legalább 2 mol/dm³-es) NaOH-oldatot, majd cseppentővel egy-két csepp $CuSO_4$ -oldatot adunk.

Tapasztalat: lila komplex képződése. Ha a mintában nem volt fehérje, kék csapadék ($Cu(OH)_2$) válik le.

Megjegyzés: a biuretpróba a fehérje két szomszédos peptidcsoportját mutatja ki; ez képez komplexet lúgos közegben a réz(II)ionnal. A névadó biuret ($NH_2-CO-NH-CO-NH_2$) – a legegyszerűbb molekula, mely pozitív tapasztalatot ad – nem fehérje.

26. Xantoproteinpróba

Végzésének módja: a vizsgálandó oldathoz tömény salétromsavat adunk.

Tapasztalat: a fehérje kicsapódik és megsárgul.

Megjegyzés: a HNO_3 a fehérjéket fölépítő aminosavak aromás oldalláncát (fenilalanin, tirozin, triptofán) nitrálja, miközben sárga vegyület képződik.

27. A tej fehérjéinek vizsgálata

Eljárás: egy főzőpohárba 20 cm³ tejet öntünk, 10 m/m%-os ecetsavat csöpögtetünk hozzá a csapadék megjelenéséig. A főzőpohár tartalmát ezután kettőöntjük két kémcsőbe. Az egyiket melegítjük. A másikat leszűrjük, majd a szűrletet melegítjük.

Tapasztalat: az ecetsav hatására fehér csapadék jelenik meg. A csapadék melegítés hatására összetömörödik. A második, szűrletet tartalmazó kémcsőben hevítés hatására fehér csapadék jelenik meg.

Magyarázat: a tej fehérjéi közül a sav a kazeint csapja ki (koagulálja). Az albumin és a globulin savakra kevésbé érzékeny, hő hatására azonban kicsapódik. A túró házi készítése során a tejet kb. 60 °C-ra melegítik, a kicsapódott tejfehérje a túró, a folyékony termék a tejsavó.

⁹ THEODOR SELIWANOFF (1859–1938) orosz vegyész 1887-ben kifejlesztett eljárása.

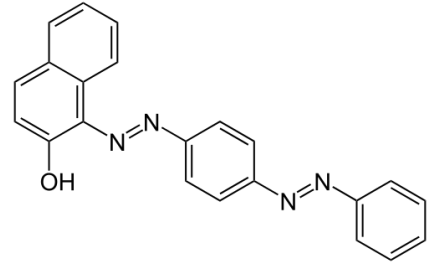
¹⁰ JEAN GUILLAUME AUGUSTE LUGOL (1786–1851) francia orvos először 1829-ben állította elő az utóbb róla elnevezett reagenst.

LIPIDEK KIMUTATÁSA

28. Lipidek kimutatása Szudán III.-mal

Végzésének módja: a mintához Szudán III.-oldatot csepegtetünk.

Tapasztalat és magyarázat: az apoláris és piros színű szerves festék, a Szudán III. (képletét lásd jobbra) a sejtben vagy oldatban ott halmozódik fel, ahol apoláros a közeg. A piros szín megjelenése utal a lipidek elhelyezkedésére. Tej esetében mikroszkóppal látható, hogy csak az apró zsírcseppek pirosodtak meg, a vizes diszpergáló közeg nem.



29. Karotinoidok kimutatása SbCl₃ kloroformos oldatával (Carr-Price-reakció)¹¹

Végzésének módja: a karotinoid oldatához vízmentes antimon-triklorid kloroformos oldatát csöpögtetjük.

Tapasztalat: kék szín megjelenése.

Megjegyzés: az Sb³⁺-ion a karotinoiddal komplexet képezve megváltoztatja a delokalizált elektronrendszer fényelnyelését.

¹¹ FRANCIS H. CARR (1874–1969) angol vegyész, ERNEST ARTHUR PRICE (szül. 1882) angol biokémikus eljárása.

ÖSSZEFOGLALÓ FELADATLAP BIOKÉMIAI ANALÍZIS TÉMAKÖRÖBŐL

Kísérletek tejjel

I. Tejbe Szudán III. festék oldatát cseppentjük, majd összerázzuk.

1. Mit tapasztalunk?
 - A) a folyadék tetején piros színű anyag gyűlt össze
 - B) az egész tej halvány piros lett
 - C) a tej kicsapódott
 - D) a tejben sárga színeződés mutatkozik
 - E) a tej kicsapódott, és a kicsapódott anyag feletti folyadék piros
2. Milyen vegyületeket mutathatunk ki a Szudán III. festékkel?
 - A) a szénhidrátokat
 - B) a neutrális zsírokat
 - C) a fehérjéket
 - D) a nukleinsavakat
3. Mi a kimutatás alapja?
 - A) a Szudán III. kémiai reakcióba lép a kimutatni kívánt vegyülettel és kicsapja az oldatból
 - B) a Szudán III. elvonja a kimutatni kívánt vegyület hidrátburkát és kicsapja azt
 - C) a Szudán III. reagál a vegyülettel és ez jellemző színváltozással jár
 - D) a Szudán III. jobban oldódik a kimutatni kívánt anyagban, mint annak diszpergáló közegében
4. Mi az oka a kísérletben tapasztaltaknak?
 - A) a kimutatott vegyület kisebb sűrűségű a víznél és azzal nem elegyedik
 - B) a kimutatott vegyület vízben valódi oldatot képez
 - C) a kimutatott vegyület a tejben emulzióban volt
 - D) a kimutatott vegyület kolloid állapota szűnt meg

II. Tejhez ecetsavat öntünk és a leváló csapadékot leszűrjük, majd mossuk. Az így elkülönített csapadékot tömény kénsavval roncsoljuk, majd az oldat semlegesítése után ismét szűrjük. A szűrlethez ezután ammónium-molibdenát-oldatot öntünk.

5. Mit tapasztalunk?
 - A) fekete csapadék leválását
 - B) vörös színreakciót
 - C) sárgás színreakciót
 - D) fehér csapadék leválását
6. Mit mutatunk ki az ammónium-molibdenát segítségével?
 - A) a vas(II)ionokat
 - B) a vas(III)ionokat
 - C) az ammóniát
 - D) a foszfátionokat
 - E) a szulfátionokat
7. A tej melyik fehérjéjét, annak melyik alkotórészét mutattuk ki?
 - A) a tej összes fehérjéjének kéntartalmát
 - B) a tej összes fehérjéjének nitrogéntartalmát
 - C) a tej kazeinjének kéntartalmát
 - D) a tej kazeinjének foszfortartalmát
 - E) a tej kazeinjének vastartalmát

III. Tejhez Fehling-I- és Fehling-II-reagens keverékét adjuk, majd a rendszert felforraljuk.

8. Mit tapasztalunk a kémcsőben forralás előtt?
- A) kék színreakciót
 - B) ibolya színreakciót
 - C) sárga színreakciót
 - D) fehér színreakciót
9. Mi ennek az oka?
- A) a tej fehérjéi kölcsönhatásba léptek a Fehling-I-reagens réz(II)ionjaival
 - B) a hidratált réz(II)ionok színe
 - C) az ezüstionok színtelenek
 - D) az aromás oldalláncok nitrálódtak a fehérjékben
10. Mit tapasztalunk a forralás során?
- A) kék csapadék vált le
 - B) fehér csapadék válik le
 - C) ibolya színeződés keletkezik
 - D) vörös csapadék válik le
 - E) a kémcső falára fémézüst válik ki
11. Mit mutatunk ki a Fehling-reakcióval?
- A) az oxidáló hatású oxocsoportokat
 - B) a redukáló hatású oxocsoportokat
 - C) a peptidkötéseket
 - D) az aromás oldalláncokat
 - E) az apoláris tulajdonságú vegyületeket
12. Mi okozza a forraláskor észlelt változást?
- A) a vizsgált vegyület oxidált alakja színes
 - B) a vizsgált részecske protonált alakja színes
 - C) a reagens fémionjainak elemi fémmé való alakulása
 - D) a reagens fémionjainak redukciója során képződő vegyület
 - E) a reagens fémionjainak oxidációja során képződő vegyület
13. Mit állapíthatunk meg a fenti /I–III./ kísérletek alapján? A fenti kísérletek alapján biztosan állíthatjuk, hogy a tej (több helyes válasz is lehetséges!):
- A) fruktózt tartalmaz
 - B) glükózt tartalmaz
 - C) ribózt tartalmaz
 - D) zsírt tartalmaz

IV. Tejhez ismét ecetsavat öntünk és a leváló csapadékot leszűrjük. Az így elkülönített csapadékhoz 40 m/m%-os NaOH-oldatot adva erőteljesen hevíteni kezdjük. A fejlődő gőzöket és gázokat Nessler-reagens oldatába vezetjük.

14. Mit tapasztalunk?
- A) sárga színreakciót
 - B) sárgásbarna csapadékot
 - C) kék színreakciót
 - D) vörös színreakciót
 - E) fehér csapadék leválását
15. Mit mutattunk ki a Nessler-reagens segítségével?
- A) a fehérje vas(II)iontartalmát
 - B) a fehérje vas(III)iontartalmát
 - C) a fehérje kéntartalmát
 - D) a fehérje foszfortartalmát
 - E) a fehérje nitrogéntartalmát

V. Ismeretlenek fiktív meghatározása

Három kémcső három különböző folyadékot – glicerint, olajsavat és növényi olajat – tartalmaz ismeretlen sorrendben. Feladatunk, hogy meghatározzuk, melyik kémcső melyik anyagot tartalmazza.

A. Mindhárom kémcsőből mintát veszünk, brómos vizet adunk hozzájuk. Összerázás után rövid ideig várunk, majd megvizsgáljuk a rendszereket. Az 1. és 3. számmal jelölt kémcsővekben két szintelen fázis figyelhető meg, a 2-es kémcső homogén, sárgásbarna oldatot tartalmaz.

16. Mire utal a brómos víz szintelenedése?

- A) a bróm jobban oldódik az apoláris anyagokban, mint a vízben
- B) a bróm bromidionná redukálódik
- C) a bróm bromidionná oxidálódik
- D) a bróm reagál a telítetlen kettős kötésekkel
- E) a bróm elpárolog

17. Milyen reakciótípus ez?

- A) oxidáció
- B) redukció
- C) sav-bázis reakció
- D) addíció
- E) szubsztitúció

18. Mire utal a fázishatár kialakulása?

- A) az eltérő sűrűségre
- B) az eltérő molekulatömegre
- C) az eltérő polaritásra
- D) az eltérő reakciókészségre
- E) az eltérő gerjeszthetőségre

19. Mit tartalmaz a 2-es kémcső?

- A) glicerint
- B) olajsavat
- C) növényi olajat
- D) glicerint vagy olajsavat
- E) olajsavat vagy növényi olajat

B. Mindhárom kémcsőből ismét mintát véve szilárd KHSO_4 -tal melegítjük őket. Az eltávozó gőzök útjába ezüst-nitrátos papírt helyezünk. A 2. és 3. kémcső esetében a papír megbarnul, az 1.-nél nem.

20. Mit mutatunk ki az ezüst-nitrátos papírral?

- A) a redukáló oxocsoportot
- B) az oxidáló oxocsoportot
- C) a telítetlen kettős kötések
- D) a karboxilcsoportokat
- E) az alkoholos OH-csoportokat

21. Mi okozza a barna színt a pozitív próba esetén?

- A) az oxidálódott oxovegyület
- B) a redukálódott oxovegyület
- C) a telítődő vegyület
- D) a kivált ezüst-oxid
- E) a kivált fémezüst

22. Mi a KHSO_4 szerepe a reakcióban?

- A) hidratáló anyag
- B) vízelvonószer
- C) redukálószer
- D) oxidálószer
- E) a lúgos kémhatást biztosítja

23. Milyen anyagokat mutatunk ki ebben a kísérletben?

- A) azokat, amelyek olajsavat tartalmaznak
- B) azokat, amelyek glicerint tartalmaznak
- C) azokat, amelyekben észterkötések vannak
- D) az apoláris anyagokat
- E) a telítetlen szénláncú anyagokat

24. A két kísérlet egybevetésével állapítsuk meg, melyik kémcső mit tartalmazott!

VI. Főzőpohárban tojásfehérjét 200 cm^3 vízzel jól összekeverünk, majd tölcserben vattacsomó segítségével átszűrjük. A kapott víztiszta szűrlet lényegében fehérje törzsoldat. Ebből az oldatból 3 kémcsőbe egyenlő mennyiségű fehérjeoldatot töltünk ki.

A. Az első kémcsövet lassan felmelegítjük.

25. Mit tapasztalunk?

- A) a kicsapódó fehérje gél állapotú kolloidot alkot
- B) a fehérje kicsapódott, és így láthatóvá vált oldatában
- C) semmiféle változás nem tapasztalható
- D) a fehérje kolloid állapotba került, és így láthatóvá vált az oldatban
- E) a kicsapódó fehérje lehülése után újra feloldódott

26. Mi volt a jelenség oka?

- A) a fehérjék hő hatására kolloid méretű részecskékké állnak össze
- B) a fehérjék hő hatására reverzibilisen koaguláltak
- C) a fehérjék hő hatására kolloid méretű részecskékre estek szét
- D) a fehérjék melegítésre aminosavakra estek szét
- E) a fehérjék hő hatására irreverzibilisen koaguláltak

B. A második kémcsőben levő fehérjeoldathoz CuSO_4 -oldatot, a harmadik kémcsőbe pedig $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -oldatot adunk. Mindkét só hatására a fehérje kicsapódik oldatából. Ezután mindkét kémcső tartalmát vízzel többszörösére hígítjuk. A réz-szulfáttal kicsapott fehérje változatlanul marad, az ammónium-szulfáttal kicsapott fehérje viszont lassan visszakerül oldatába.

Relációanalízis

- 27. Közvetlen módon mindkét só ugyanolyan hatást gyakorol a fehérjékre, mint a hőmérséklet emelkedése, mert mindkét só irreverzibilisen csapja ki a fehérjét.
- 28. A réz(II)-szulfát hatására véglegesen megváltozik a fehérjemolekula lánckonformációja, mert véglegesen felszakadnak a lánckonformációt biztosító kötéstípusok.
- 29. Az ammónium-szulfát hatására átalakul a fehérjemolekula lánckonformációja, felszakadnak a peptidkötések, mert az ammónium-szulfát megbontja a fehérjét körülvevő hidrátburkot.
- 30. A réz(II)-szulfát és az ammónium-szulfát hatására a fehérjeoldatra nézve különböző, mert a réz-szulfát a fehérjeszerkezet alapvető és végleges változását okozza, az ammónium-szulfát viszont csak a fehérjemolekulák hidrátburkát és leggyengébb kötéseit bontja fel.

Többszörös választás (több helyes válasz is lehetséges)

31. Miért kerülnek vissza a fehérjék kolloid állapotba a reverzibilis koaguláció után?

- a) a hígítás hatására visszaáll az eredeti hidrátburkok
- b) az ionok elvesztik hidrátburkukat
- c) helyreállnak a fehérje lánckonformációját rögzítő kötések
- d) helyreállnak az elszakadt peptidkötések

32. Mi okozhat irreverzibilis koagulációt?

- a) szobahőmérséklet
- b) magas hőmérséklet
- c) ammónium-szulfát
- d) réz(II)-szulfát

33. A kísérletben alkalmazott tényezőkön kívül mi befolyásolja még a fehérjék kolloid állapotát?
- a) a környezet fényviszonyai
 - b) a környezet fehérjekoncentrációja
 - c) a környezetben levő víz mennyiségének növekedése
 - d) a környezet hidrogénionkoncentrációja

MEGOLDÁSOK

1. B	11. B	21. E	31. B (a, c)
2. B	12. D	22. B	32. C (b, d)
3. D	13. D	23. B	33. D (d)
4. C	14. B	24. 1. – olajsav, 2. – glicerin, 3. – növényi olaj	
5. C	15. E	25. B	
6. D	16. D	26. E	
7. D	17. D	27. C (+, –)	
8. B	18. C	28. A (+, +, +)	
9. A	19. A	29. D (–, +)	
10. D	20. A	30. A (+, +, +)	

FELHASZNÁLT FORRÁSOK

BARCZA LAJOS–BUVÁRI ÁGNES: *A minőségi kémiai analízis*. Bp., Medicina, 2008.⁶

Biológia és kémia középszintű szóbeli érettségi tételek megoldásokkal, pontozási útmutatóval. Új kémiai kísérletek. Szerk. KOVÁCSNÉ CSÁNYI CSILLA, KELÉDINÉ MÁZIK ILDIKÓ. Bp., Fővárosi Pedagógiai Intézet, 2006.
[különösen 7–8., 25–26 o., MÜLLNER ERZSÉBET szerzői része]

GÖMÖRY ANDRÁS–MÜLLNER ERZSÉBET–SZERÉNYI GÁBOR: *Biológia II. A gimnáziumok 11. évfolyama számára*. Bp., Műszaki, 2011.⁴ 20–21.
[különösen 20–21. o.]

MÜLLNER ERZSÉBET: *Biológiai gyakorlatok és vizsgálatok*. Bp., Műszaki, 2003.
[különösen 15–40., 166–169., 183–199. o.]
[Eredeti változata: MÜLLNER ERZSÉBET: *Biológiai gyakorlatok középiskolásoknak. 9–12. osztály*. Szeged, Mozaik, 1998.]

Szerves kémiai praktikum. Szerk. OROSZ GYÖRGY. Bp., Nemzeti Tankönyvkiadó, 1998.
[különösen 377., 386., 389–390. o.]

VILLÁNYI ATTILA: *Kémia tesztgyűjtemény középiskolásoknak*. Bp., Műszaki, 2012.⁷
[különösen 199–202. o.]